

報 文

ポータブルフローインジェクション分析計の開発と窒素
酸化物のオンサイト分析

樋口 慶郎*, 井上亜希子**, 玉之内啓満**, 服部 隆康***, 本水 昌二®*

On-site analysis for nitrogen oxides using a newly developed portable
flow injection analyzer

Keiro HIGUCHI*, Akiko INOUE, Hiromitsu TAMANOUCHI**,
Takayasu HATTORI*** and Shoji MOTOMIZU*

*Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University, 3-1-1, Tsushimanaka, Okayama 700-8530

**FIA Division, Tokyo Kasei Kogyo Co. Ltd., 6-15-9, Toshima, Kita-ku, Tokyo 114-0003

***Scientific Instrument Division, Asahi Technicon Co. Ltd., 1-3-8, Shinmojikita, Moji-ku, Kitakyusyu-shi, Fukuoka 800-0113

(Received 21 December 1998, Accepted 1 February 1999)

A new portable flow injection system was developed for on-site chemical analysis, which allows the rapid analysis of aqueous samples at sampling sites. The system comprises a newly designed double-plunger micro pump, a six-way sample injector, a reaction coil in a thermostated compartment and a detector. All of these units are connected with 0.5 mm i.d. PTFE tubing. A visible detector is assembled using a maximum wavelength of 525 nm of a light-emitting diode (LED) and 540 nm of an interference filter. The system is of the one-box type, whose dimensions are 160(W) × 160(H) × 320(D) mm, and is easy to carry to the analysis site; the weight is 8 kg. A thermostated compartment is incorporated into the proposed system in order to be used outdoors, where temperatures are changeable. The system can work with DC 12 V as well as AC 100 V; therefore, a car battery or a portable battery can be used as the power source. The analytical data can be memorized in IC cards or a note-book personal computer connected with a RS232C cable. Furthermore, software on the market can be easily used. By using the proposed system, the on-site determination of nitrogen oxides, such as nitrate and nitrite, could be carried out. Calibration graphs for nitrate and nitrite ions were linear over ranges of 0 to 1.0 ppm and 0 to 100 ppb of N-NO_3^- and N-NO_2^- with good precision; the sampling rate was 40 ~ 50 samples per hour. The detection limit for N-NO_3^- and N-NO_2^- was 0.5 ppb. By using the proposed system, the on-site determination of nitrate and nitrite in river water samples was carried out. The relative standard deviations of ten injections were 0.65% for nitrate and 0.15% for nitrite. Furthermore, nitrate and nitrite in biological samples as a metabolic products of nitric oxide, which have attracted a lot of attention as a messenger of diverse physiological processes, were also determined on-site with high sensitivity. By using a car battery as a power source, the proposed system worked continuously. In addition, it worked for about 5 hours continuously with a portable battery.

Keywords : on-site analysis; portable flow injection analyzer; determination of nitrogen oxide; nitrate and nitrite.

1 緒 言

近年、試料採取現場での迅速な分析、すなわちオンサイト分析の重要性が認識されてきた。環境分野においては、地球温暖化、オゾン層破壊、酸性雨、大気汚染、海洋汚染が顕在化し、地球規模での様々な問題が深刻化している。これら諸問題の解決のためには、まず環境問題を引き起こす原因物質の存在形態、存在状態、存在量などの正確な実態把握が必要である。そのためには信頼できるオンサイト化学分析が不可欠である。

フローインジェクション分析法 (FIA) は分析の迅速性、簡便性を主要な利点としているが、更に試薬、試料、廃液の大幅な低減化も可能で、しかも精密に制御された連続流れを用いていることから、溶媒抽出やガス透過などの前処理のオンライン化も容易である。したがって、様々な分析現場において分析の迅速化、簡便化に加え、分析の感度、精度、正確さの向上を指向した化学分析の高度化を達成する方法として FIA は最適であり、オンサイト分析を実現する上で最も有効な手段と考えられる。FIA によるオンサイト化学分析の例としては、イオン電極を用いる Dimitrakopoulos らの報告¹⁾、Motomizu らによるリンと窒素の定量²⁾、馬らによる発光ダイオード (LED) を光源とした検出器を用いる硝酸、亜硝酸イオンの定量³⁾についての報告がある。いずれも流量 $50 \mu\text{l min}^{-1}$ 、試料量 $20 \mu\text{l}$ 程度のマイクロ FIA システムを基本としており、流路体積の微量化、硝酸イオン還元のような、カドミウム-銅 (Cd/Cu) 還元カラムのマイクロ化などの技術が必要である。

本研究では、通常の FIA 技術がそのまま利用でき、しかもシステムの小型・軽量化を推進した新しいタイプのポータブルフローインジェクション分析計 (portable flow injection analyzer: PFA) の構築を検討した。そして、その応用として環境試料や生体試料中に様々な形態をとって存在する窒素酸化物のオンサイト分析について検討した。窒素酸化物の定量法としては、JIS をはじめとする多くの公定法に規定されているカドミウム-銅カ

ラム還元-ナフチルエチレンジアミン吸光光度法⁴⁾を採用した。装置や試薬に関しては著者らの既報⁵⁾を参考にポンプ、検出器や反応恒温槽の小型、一体化やカドミウム-銅カラムの還元性能維持等を中心に改良を行った。そして実際に試料採取現場に今回の PFA 装置を持ち込み、オンサイト分析について検討を行った。

2 実 験

2.1 装 置

今回の PFA 装置の開発は、旭テクネイオン製高速液体クロマトグラフ HC-2001 型をベースとしているが、プランジャー送液系、試料注入系、流路系、反応槽系、検出系などを FIA 用に全面的に改良することにより行われた。また、データはノート型パーソナルコンピュータ (NPC) に取り込み、市販の表計算ソフトを利用してデータ処理できるように改良した。既に馬らもこの機種に注目し、流量 $50 \mu\text{l min}^{-1}$ での安定した送液を行うために、1 ストローク当たりの吐出量を $2.5 \mu\text{l}$ に改造した装置を報告している³⁾。本研究では、通常の流量範囲 $0 \sim 1.5 \text{ ml min}^{-1}$ での送液を行うため、HC-2001 のポンプ部を新たにプランジャー径 2 mm 、ストローク長さ 4 mm に改造した。このとき 1 ストローク当たりの吐出量は $12.5 \mu\text{l}$ であった。ポンプヘッドは耐薬品性を考慮して、ポリエーテルエーテルケトン (PEEK) 材を用いて製作した。試料注入バルブは耐薬品性の観点からフロム製六方バルブに取り換え、 $100 \mu\text{l}$ の試料ループを装着して用いた。吸光検出器は、HC-2001 の光源である水銀ランプを 525 nm の LED に交換し、 540 nm の干渉フィルターを使用することとした。フローセルは内径 0.8 mm 、光路長 10 mm 、セル容量 $5 \mu\text{l}$ のものを装着した。温度変化の大きな屋外での使用に耐えられるように、アルミブロック製の空気恒温槽を装着して、この中に内径 0.5 mm 、長さ 2 m のポリテトラフルオロエチレン (PTFE) チューブからなる反応コイルを納めた。以上の FIA 基本要素部分を幅 160 mm 、高さ 160 mm 、奥行き 320 mm の箱の中に配置した。この装置は交流 100 V のほか、バッテリー駆動を想定して直流 12 V でも稼働するように設計した。得られるデータはペンレコーダーでも記録できるが、メモリーカードや RS232C による NPC への送信も可能にした。その際の時間分解能は 0.1 秒である。硝酸イオン還元のための還元カラムは、内径

* 岡山大学理学部: 700-8530 岡山県岡山市津島中 3-1-1

** 東京化成工業(株)FIA 研究グループ: 114-0003 東京都北区豊島 6-15-9

*** 旭テクネイオン(株)科学機器工場: 800-0113 福岡県北九州市門司区新門司北 1-3-8

Table 1 Specifications of the proposed portable flow injection analyzer and experimental conditions for the determination of nitrate and nitrite

Pump	double-plunger micro pump; flow rate: 1.0 ml min^{-1} plunger diameter: 2 mm; plunger stroke: 4 mm
Sample injector	six-way rotary valve; sample loop: $100 \mu\text{l}$
Detector	light source: 525 nm light emitting diode; 540 nm interference filter path length: 10 mm; cell volume: $5 \mu\text{l}$
Reaction temperature	40°C controlled air bath; reaction coil: $0.5 \text{ mm i.d.} \times 2 \text{ m}$ PTFE tubing in controlled air bath
Carrier solution	NH_4Cl (3 g l^{-1}), EDTA (0.7 g l^{-1}), pH 8.2
Reagent solution	Sulfanilamide (1 g l^{-1}), N-1-Naphthylethylenediamine (0.1 g l^{-1}) 0.1 M HCl
Power source	DC 12 V or AC 100 V
Recorder	strip chart recorder, memory card or note-type personal computer (RS232C)
Size	$160 \text{ (W)} \times 160 \text{ (H)} \times 320 \text{ (D)} \text{ mm}$
Weight	8 kg

2 mm, 外径 6 mm, 長さ 10 cm のガラス管に市販の Cd/Cu を充填してダイフロン製ジョイントを製作して, 流路に組み入れた. 本装置の概要を Table 1 にまとめた.

2.2 試 薬

既報⁴⁾に従って調製した. 本実験で使用する水は, すべてミリ Q-ラボ (Millipore 製) により精製したものをを用いた.

キャリアー溶液: 塩化アンモニウム 3 g とエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 0.7 g を水に溶かし, 6 M 水酸化ナトリウム溶液で pH 8.2 に調節した後, 水で正確に 1 l にした.

発色試薬溶液: スルファニルアミド 1 g と N-1-ナフテルエチレンジアミン 0.1 g を 0.1 M 塩酸 1 l に溶かして調製した. なお, この溶液は用事調製することとした.

硝酸イオン, 亜硝酸イオン標準液: 105°C で 3 時間乾燥した硝酸カリウムと亜硝酸ナトリウムを水に溶かし, それぞれ, 硝酸態窒素, 亜硝酸態窒素として 1000 ppm, 又は $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ 溶液を調製した. 使用に際してはこの溶液を水で適宜希釈して用いた.

2.3 実験操作

本研究で使用した FIA のフローダイアグラムを Fig. 1 に示す. 六方バルブを用いてキャリアー溶液中に試料 $100 \mu\text{l}$ を注入する. 試料はまず Cd/Cu 還元カラムを通過する. このとき硝酸イオンは亜硝酸イオンに還元される. この後発色試薬と混合され, 40°C に加熱した反応恒溫槽内に納められた反応コイル中でジアゾ化カップリング反応が進行する. その生成物のアゾ染料の吸光度を

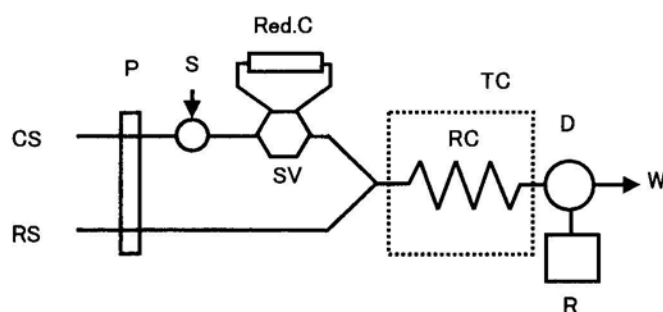


Fig. 1 Schematic diagram of flow system for nitrate and nitrite

CS: carrier solution (EDTA + NH_4Cl); RS: reagent solution (Sulfanilamide + N-1-Naphthylethylenediamine); P: double-plunger micro pump (each flow rate: 0.5 ml min^{-1}); S: sample injector ($100 \mu\text{l}$); Red.C: Cd/Cu reduction column ($2 \text{ mm i.d.} \times 10 \text{ cm}$); SV: column switching valve; RC: reaction coil ($0.5 \text{ mm i.d.} \times 2 \text{ m}$); TC: temperature controlled air bath (40°C); D: detector (540 nm); R: recorder; W: waste

540 nm で測定して硝酸, 亜硝酸イオンの含量として定量を行う. また, データはデータ処理部に取り込み, RS232C で NPC に導き, 結果の表示を行うこともできる. また, 流路に切り替えバルブを組み込むことにより, 還元カラムを通さず亜硝酸イオンのみを定量できるようにした. 硝酸イオン濃度は両者の差から計算によって求めた.

3 結果及び考察

3.1 PFA の開発

オンサイト化学分析のための PFA 装置の有すべき必

要条件としては、(1) 屋外でも温度変化等の影響を受けにくく、安定した測定ができること、(2) 測定データの記録、保存ができること、(3) 簡単に持ち運び可能な小型・軽量の一体型装置であること、(4) 現場での装置のセッティングが容易で、スピーディーであること、(5) 自動車や船舶による移動、振動に耐えられること、(6) バッテリー駆動方式であること、(7) 測定までのウォーミングアップ時間が少なく済むこと、などである。本研究ではこれらの条件を満たす化学分析手法として、フローインジェクション方式に基づく方法が最も可能性が高いと判断し、検討を進めた。

本研究で改造を試みた旭テクネイオン製 HPLC に搭載されている小型ダブルプランジャーポンプは、流量 $0 \sim 400 \mu\text{l min}^{-1}$ ($1 \mu\text{l}$ ステップ) のマイクロ送液が標準であるが、通常の FIA で用いる $0 \sim 1.5 \text{ ml min}^{-1}$ の範囲の送液が可能なポンプに改造した。なお、この改造により、プランジャー径は 2 mm 、ストローク長さ 4 mm としたため、1 ストローク当たりの吐出量は $12.5 \mu\text{l}$ となったが、ベースラインの安定性や反応効率の面で、通常よく用いられている 1 ストローク当たりの吐出量 $5 \sim 8 \mu\text{l}$ のプランジャーポンプとほとんど同じであり、高感度分析にも十分耐えられる性能を有していることが分かった。ポンプヘッドや接液部は PEEK 樹脂を用い、材質からの汚染防止と腐食に耐えられるように工夫した。

吸光検出器は 525 nm の LED を光源とし、検出するアゾ化合物の吸収極大波長に相当する 540 nm の干渉フィルターを装着した。LED を光源にすることにより省電力化、 12 V バッテリー駆動が可能となり、更に光源の安定化、長寿命などポータブル化の観点から多くの利点が生まれた。

フローセルは内径 0.8 mm 、光路長 10 mm でセル容量は $5 \mu\text{l}$ とセル内での分散の影響が少なくなるように配慮した。

屋外でのオンサイト分析においては温度変化の影響が考えられるので、ベースラインの安定化、測定精度、正確さの向上などを考慮してアルミヒートブロック方式の空気恒温槽を装備し、この中に反応コイルを納めた。更に送液ポンプ、試料注入バルブ、検出器、恒温槽及び PTFE チューブの流路系を一つの箱の中に配置したことも外部環境の変化から装置全体を保護することに大きな効果を示し、安定した再現性良い測定が可能となった。箱の大きさは、幅 160 mm 、高さ 160 mm 、奥行き 320 mm で、総重量は 8 kg と持ち運びが容易である。

今回の PFA は交流 100 V での稼働のほか、直流 12 V での駆動が可能で、交流 100 V 電源のない屋外での測定

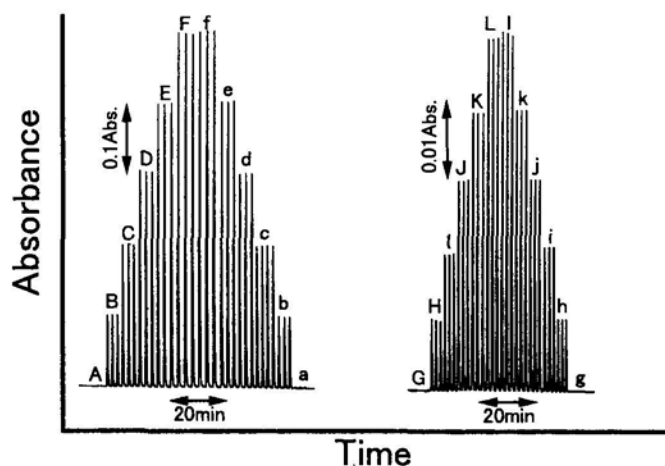


Fig. 2 Flow signals for the calibration graphs of nitrate and nitrite

[N-NO_2^-], ppm: A, 0; B, 0.2; C, 0.4; D, 0.6; E, 0.8; F, 1.0. [N-NO_3^-], ppm: a, 0; b, 0.2; c, 0.4; d, 0.6; e, 0.8; f, 1.0. [N-NO_2^-], ppb: G, 0; H, 20; I, 40; J, 60; K, 80; L, 100. [N-NO_3^-], ppb: g, 0; h, 20; i, 40; j, 60; k, 80; l, 100

のためには、カーバッテリーや市販のポータブルバッテリーが利用できる。

3.2 硝酸イオン、亜硝酸イオン定量のための検量線

今回の PFA による硝酸、亜硝酸イオンの検量線フローシグナルをペンレコーダーで出力した例を Fig. 2 に示す。検量線は硝酸イオン (N-NO_3^- として)、亜硝酸イオン (N-NO_2^- として) 共に $0 \sim 1.0 \text{ ppm}$ 及び $0 \sim 100 \text{ ppb}$ の範囲で良好な直線性を示した。同じ濃度の硝酸、亜硝酸イオンのピークの高さが等しいことから、硝酸イオンから亜硝酸イオンへの還元率はほぼ 100% であることが分かる。また、 0.600 , 0.060 , 0.020 ppm 硝酸態窒素標準液を用いた 10 回の繰り返し測定における相対標準偏差は 0.36 , 0.39 , 0.75% であった。今回の PFA によれば 1 時間当たり $40 \sim 50$ 試料の測定が可能であった。また、 $S/N = 3$ における検出限界は、硝酸、亜硝酸態窒素として 0.5 ppb であった。

3.3 PFA による河川水中の硝酸、亜硝酸イオンのオンサイト分析

著者らは、今回採用した測定方法を用いた通常の FIA システムによる環境水中の硝酸、亜硝酸イオンの定量結果は JIS 法⁴⁾と比較して良好な相関があることを既に報告した⁶⁾。1998 年 6 月、水道水質基準の一部改正が行われ、監視項目として亜硝酸態窒素が追加された。その基準値は亜硝酸態窒素で 50 ppb 以下で、実際にはその 10

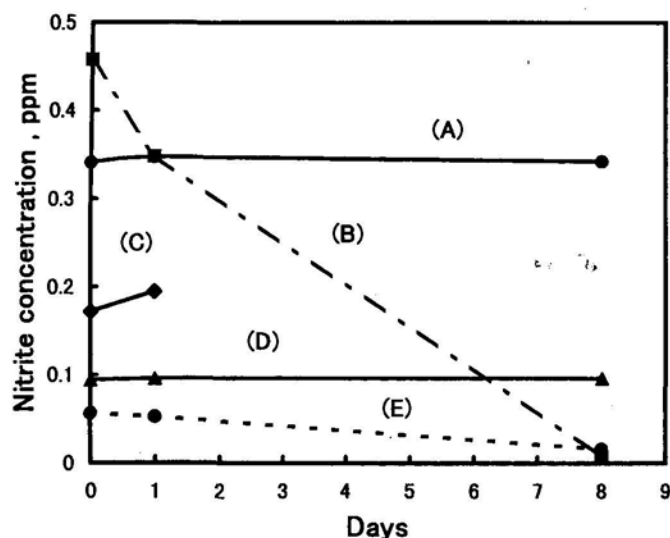


Fig. 3 Effect of standing time after sampling on the concentration change of nitrite in river water samples

(A) Ara River (Tokyo); (B) Shakuji River (Tokyo); (C) Sumida River (Tokyo); (D) Furou River (Saitama); (E) Tama River (Tokyo).

分の1の濃度の5 ppb程度の検出ができることが望まれる。一方、環境水中の亜硝酸イオン濃度は、試料保存中に共存する物質の影響で著しい変化を示す可能性が考えられる。河川水試料中の亜硝酸イオン濃度の採取後の経時変化を本PFAで測定した例をFig. 3に示す。試料によってはほとんど変化がないものもあるが、著しい濃度減少を見せる試料や、逆に濃度上昇を示す試料もあり、正確な分析情報収集のためには、試料採取現場での迅速な分析、オンサイト分析の重要性が明らかである。

今回のPFA装置では、RS232C通信ポートより、NPCでのデータの読み出しが可能である。NPCより読み出したデータは、フローシグナルのほか、各々のピークの面積及び高さが表示され、それと同時に市販の表計算ソフト、例えばExcelなどで処理が可能である。埼玉県戸田市の荒川河辺にPFA装置を設置し、松下電工製ポータブルバッテリー(ERV713)を電源として河川水中の硝酸、亜硝酸イオンのオンサイト分析を行った。亜硝酸態窒素0~1.0 ppmの検量線シグナル及び河川水試料を10回繰り返し注入したときのフローシグナルをFig. 4に示す。更にNPC上で計算した結果、亜硝酸態窒素濃度 0.143 ± 0.0002 ppm, 相対標準偏差0.15%と良好な結果が得られた。屋外での実験では、充電したポータブルバッテリーで今回のPFA装置は5時間の連続運転が可能であった。

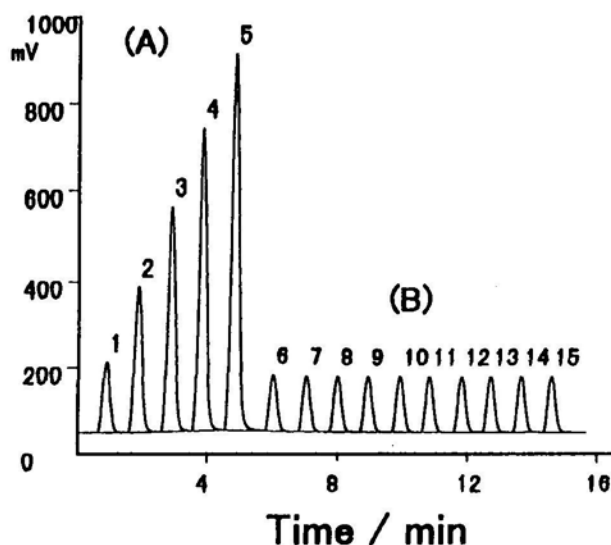


Fig. 4 Flow signals for the on-site analysis of nitrite in river water

(A) $[N-NO_2^-]$, ppm: 1, 0.2; 2, 0.4; 3, 0.6; 4, 0.8; 5, 1.0. (B) Reproducibility test: 6~15, ten injections of river water sample. The absorbance corresponding to 1000 mV on the vertical axis is 1.000 in this case.

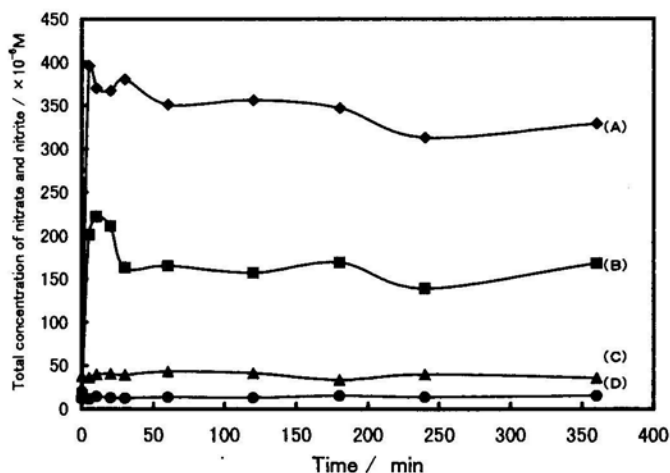


Fig. 5 Change in the total concentration of nitrate and nitrite in dog serum by the intravenous injections of sodium nitrate

(A) The intravenous injection of sodium nitrate of 10 mg per kg of dog weight; (B) The intravenous injection of sodium nitrate of 5 mg per kg of dog weight; (C) and (D) not injected control dog.

3・4 血清中の硝酸、亜硝酸イオンの定量

生体内で生成する一酸化窒素(NO)の血管弛緩や情報伝達などの生理作用が近年注目されている^{7)~9)}。NOは一般に存在寿命が極めて短く、直接定量することは困難である。したがってNOの測定法の一

つとして、NOの酸化代謝物である硝酸、亜硝酸イオンを定量してNOの生成量を推測する方法がある¹⁰⁾。著者らは水酸化ナトリウム-硫酸亜鉛を用いる除タンパク前処理とFIAをカップリングすることにより尿、血清、細胞培養液中の硝酸、亜硝酸イオンを簡便で迅速かつ高感度に定量する方法を報告した⁵⁾。本研究では試料採取現場に、今回のPFA装置を持ち込んでオンサイト分析について検討した。イヌに、硝酸ナトリウム水溶液を5と10 mg/kgの割合で静脈注射し、直後から順次採血して、血清中の硝酸、亜硝酸イオンの含量を測定した。Fig. 5にその結果を示す。除タンパク操作は既報⁵⁾に従って行った後、PFAに注入した。コントロールとしたイヌC及びDと比較して、硝酸ナトリウムを注射したイヌA及びBの血清中の硝酸、亜硝酸イオン濃度は、その注射液濃度に比例して、ほぼ予想された濃度で回収されていた。このように、イヌ血清中の硝酸、亜硝酸イオンの代謝の状態を詳細に把握することが今回のPFAによって可能となった。

従来のFIA装置を小型・軽量化し、検出器にLEDを使用し、直流12Vで駆動できるオンサイト分析のためのポータブルフローインジェクション分析計(PFA)を開発した。本分析計の性能は、従来型のFIA装置と全く同等の感度、精度を有していることが分かった。実際に屋外においてポータブルバッテリーを使用して河川水

中の硝酸、亜硝酸イオンのオンサイト分析を行ったところ、なんら支障なく、再現性の良い測定結果が得られた。

本研究は(財)中国電力技術研究財団試験研究助成金により行われた。ここに感謝する。

文 献

- 1) T. Dimitrakopoulos, P. W. Alexander, D. B. Hibbert, L. Cherkson, J. Morgan: *Electroanalysis*, **7**, 1118 (1995).
- 2) S. Motomizu, M. Oshima, L. Ma: *Anal. Sci.*, **13** (supplement), 401 (1997).
- 3) 馬 蘭, 大島光子, 本水昌二, 服部隆康: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **47**, 375 (1998).
- 4) JIS K 0102, 工場排水試験方法 (1993).
- 5) K. Higuchi, S. Motomizu: *Anal. Sci.*, **15**, 129 (1999).
- 6) 樋口慶郎, 山崎隆治, 井上亜希子, 小川祐子: Separation Sciences '95 講演要旨集, p. 101 (1995).
- 7) R. M. J. Palmer, S. Moncada: *Biophys. Res. Commun.*, **158**, 348 (1989).
- 8) T. Malinski, Z. Taha: *Nature* (London), **358**, 676 (1992).
- 9) Jr. J. F. Kerwin, Jr. J. Lancarster, P. L. Feldman: *J. Med. Chem.*, **38**, 4343 (1995).
- 10) L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum: *Anal. Biochem.*, **126**, 131 (1982).

要 旨

試料採取現場での迅速な分析、すなわちオンサイト分析のための新しいポータブルフローインジェクション分析計の開発を行った。このFIA装置では、160×160×320 (mm)の箱の中にダブルプランジャーマイクロポンプ、試料注入器、検出器及び反応恒温槽を組み入れ、重量8 kgと小型・軽量化を達成し、持ち運び容易な分析計とした。特に、525 nmの発光ダイオード(LED)を光源とする新規検出器を開発することにより、小型、省電力化が可能となった。温度変化の大きな屋外での測定に耐えられるように、反応恒温槽も装備した。本FIA装置は交流100 Vでのほか、直流12 Vでも稼働し、カーバッテリーや市販のポータブルバッテリーを電源とするオンサイト分析に対応できるよう設計した。カーバッテリーを電源とした場合は長時間の連続運転が可能である。測定データはメモリーカードやRS232Cによりノート型パーソナルコンピュータへの通信も可能で、更に市販の表計算ソフトを利用してデータ処理が可能である。本装置を窒素酸化物のオンサイト分析に応用した。硝酸、亜硝酸イオン標準液による検量線は、0～1.0 ppm, 0～100 ppbの範囲で直線性、再現性共に良好で、1時間当たり40～50試料の分析が可能であった。検出限界($S/N=3$)は硝酸、亜硝酸態窒素として0.5 ppbと通常のFIAシステムを用いる場合と全く変わらない優れた性能を有することが分かった。河川水中の硝酸、亜硝酸イオンのオンサイト分析では10回の繰り返し測定における相対標準偏差は0.65%及び0.15%と良好な結果が得られた。また、血清中の一酸化窒素(NO)の酸化代謝物としての硝酸、亜硝酸イオン濃度のオンサイト分析を行い、良好な結果を得た。本研究で検討したポータブルバッテリーでは1回の充電で5時間の連続運転が可能であった。